

Branched chain amino acid metabolism in portal-systemic shunting : experimental studies in the rat

Citation for published version (APA):

de Boer, J. E. G. (1984). *Branched chain amino acid metabolism in portal-systemic shunting : experimental studies in the rat*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Rijksuniversiteit Limburg. <https://doi.org/10.26481/dis.19841214jb>

Document status and date:

Published: 01/01/1984

DOI:

[10.26481/dis.19841214jb](https://doi.org/10.26481/dis.19841214jb)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Download date: 05 May. 2023

S U M M A R Y

The subject of this thesis concerns the mechanism(s) involved in the genesis of decreased levels of branched chain amino acids (BCAA) in plasma from patients and experimental animals with liver failure and portal systemic shunting (PSS). Hyperinsulinism, encountered in liver patients and experimental animals with PSS, has been proposed to be a cause of an increased peripheral uptake of BCAA. This peripheral uptake, however, has never been well defined. Insight into the mechanism may be relevant to the understanding of the pathogenesis of hepatic encephalopathy (HE) and of the high catabolic rate prevailing in hepatic failure. In addition, a better understanding of the regulation of the plasma BCAA levels in pathologic conditions may lead to a rational application of BCAA-enriched infusion solutions in severely catabolic patients with low plasma BCAA levels.

In chapter I, a short review is given of the involvement of BCAA in various aspects of clinical interest. The role that BCAA play in several hypotheses, is briefly described. BCAA might serve as alternative energy substrate when carbohydrates and fat are not available or cannot be used in sufficient amounts. The validity of this hypothesis is questionable, however, because the contribution of BCAA degradation to overall energy requirement is very small. A second hypothesis claims that leucine, one of the BCAA, has special anabolic properties, and functions as a regulator of protein turnover. Furthermore, BCAA are implicated in a hypothesis that links encephalopathy to the altered levels of BCAA and aromatic amino acids (AAA) in the plasma of patients and experimental animals with liver failure and portal-systemic shunting. These hypotheses furnish the rationale for the administration of BCAA-enriched solutions.

Several disease states and altered nutritional states can influence plasma BCAA levels. Some of these conditions may accompany liver disease and may therefore exert an additional influence on the plasma BCAA levels.

The possible role of several organs and tissues in the in vivo regulation of plasma BCAA levels is discussed. Muscle and adipose tissue must play a predominant role in BCAA degradation judging from the ability to degrade BCAA and from the relative size of these tissues in the body. Some influences that may affect the BCAA degrading ability in vitro, may also be of relevance for the in vivo situation. These include transport of BCAA across cell membranes, sensitivity of the tissues for insulin and activities of enzymes involved in the degradation of BCAA.

To study mechanisms underlying the decrease of plasma BCAA levels in patients or animals with compromised liver function, an animal model is needed that exhibits both hyperinsulinism and low plasma BCAA levels. In addition, this animal model should not suffer from superimposed disorders that might influence plasma BCAA levels such as, e.g. malnutrition, starvations, diabetes or sepsis. Such an animal model (rats with a porta-caval shunt (PCS)) is described in chapter II. The model was carefully characterized with respect to relevant parameters in relation to the time after the operation. It was found that PCS rats exhibit hyperinsulinism and low plasma BCAA levels until 3 weeks after operation. Generally, PCS rats in our institute were in good health compared with those described in the literature.

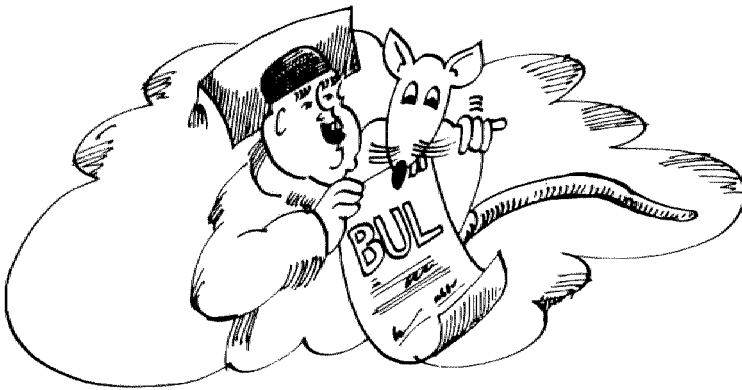
Muscle (diaphragm) and epididymal adipose tissue segments from PCS-operated and sham-operated rats were excised 2½ weeks post-operatively and used for in vitro studies of BCAA metabolism (chapters III and IV). Porta-caval shunting did not affect or even decreased the rate of irreversible degradation of BCAA in muscle but greatly increased this rate in adipose tissue. After PCS, the rates of decarboxylation of the BCAA in adipose tissue appeared to be increased to the same extent. The part of the BCAA carbon skeleton that remains after irreversible decarboxylation in adipose tissue, was used for incorporation into fat (mainly triglycerides) or degraded to CO_2 , indicating that other pathways of BCAA catabolism in adipose tissue are negligible. In contrast, degradation of BCAA in muscle was incomplete. In adipose tissue from PCS rats were more BCAA degraded, even in the postabsorptive state, than in adipose tissue from fed control rats, indicating that this process is under long-term regulation. It was concluded that adipose tissue is extremely important in the degradation of BCAA. After PCS, this role is even more accentuated and it appears that

adipose tissue, and not muscle, contributes to the decrease in plasma BCAA levels after PCS. Protein synthesis in muscle and fatty acid synthesis in adipose tissue were increased after PCS. Because of the smaller muscle mass and fat mass in PCS rats compared with controls, these increases indicate that increased protein and fatty acid turnover must occur. Increased protein turnover has also been observed in cirrhotic patients.

The ability to degrade BCAA in muscle and adipose tissue is mainly determined by the activity of the branched chain oxoacid dehydrogenase (BCOA-DH), which is the rate-limiting enzyme in BCAA degradation in these tissues. The activity of this enzyme can be influenced by insulin in adipose tissue, but not in muscle. Based on the BCAA degradation rates, it was postulated that, after PCS, adipose tissue would exhibit an increased BCOA-DH activity, while this activity in muscle was expected to be unaffected or to be decreased. These expectations were confirmed in experiments described in chapter V. This may indicate that elevated insulin levels after PCS induce an increased BCOA-DH activity in adipose tissue. The relevance of these findings is discussed in chapter VI.

The results furnish support for the hypothesis that hyperinsulinism is instrumental in the decrease of the BCAA levels in plasma after PCS. Increased ammonia levels may exert an additional influence on plasma BCAA levels. The view is expressed that hyperinsulinism is a consequence of simultaneous increases of catecholamines, glucagon and cortisol levels encountered in liver disease and reflecting a stressed state. Findings in rats with diabetes or obesity, exhibiting altered plasma insulin and BCAA levels, suggest that the mechanism involved in changing plasma BCAA levels may be more general.

Increased protein and fatty acid synthesis and increased degradation of BCAA in adipose tissue all appear to reflect a well-fed state signalled by increased insulin levels. PCS rats, however, are generally less well-fed than control rats. Increased catabolism occurring in PCS rats, may therefore be induced by insulin, erroneously signalling the well-fed state. The BCAA carbon skeletons remaining after decarboxylation were less completely degraded in muscle after PCS which argues against a muscle energy deficit.



SAMENVATTING

Het onderwerp van dit proefschrift betreft het mechanisme dat verantwoordelijk is voor de verlaging van de spiegels van de vertakte keten aminozuren (VKAZ) in het plasma van patienten en proefdieren met leverlijden en shunting van portaal bloed buiten de lever om naar de vena cava (portaal systemische shunting (PSS)). Van oudsher zijn de verhoogde insulinespiegels die bij leverpatienten en bij proefdieren met PSS gevonden worden, genoemd als de mogelijke oorzaak van verhoogde perifere opname van VKAZ, zonder dat precies gespecificeerd is waar en hoe dit gebeurt. Inzicht in dit mechanisme is van belang voor de pathogenese van hepatische encephalopathie (HE) en voor de verhoogde netto afbraak van lichaamseiwit die vaak wordt waargenomen bij leverlijden. Bovendien is een beter begrip van de regulering van plasma VKAZ spiegels onder pathologische condities van belang voor een rationeel gebruik van infusievloeistoffen die verrijkt zijn met VKAZ, in ernstig katabole patienten met lage plasma VKAZ spiegels.

Hoofdstuk I geeft een kort overzicht van die aspecten van de VKAZ, die van belang zijn voor de kliniek. In het kort wordt de rol beschreven die aan de VKAZ wordt toegedacht in verschillende hypothesen. VKAZ zouden kunnen dienen als alternatieve energiebron in situaties waarin koolhydraten en vet niet voorhanden zijn of niet in voldoende mate gebruikt kunnen worden. Het is echter de vraag of deze hypothese juist is. De bijdrage die afbraak van VKAZ kan leveren aan de totale energiebehoefte, is namelijk maar heel gering. Volgens een tweede hypothese bezit leucine, één van de drie VKAZ, speciale anabole eigenschappen en vervult leucine een regulerende functie bij de opbouw en afbraak van eiwitten. Verder spelen VKAZ een rol in een hypothese die een verband legt tussen encephalopathie en veranderde plasma spiegels van VKAZ en aromatische aminozuren (AAZ) in het plasma van patienten en proefdieren met leverlijden en portaal-systemische shunting van bloed. Deze hypothesen verschaffen de argumenten om met VKAZ verrijkte voedingsoplossingen toe te dienen.

Diverse ziekten en veranderde voedingstoestanden kunnen de plasma VKAZ spiegels beïnvloeden. Enkele van deze invloeden kunnen ook optreden bij leverlijden.

De mogelijke rol die verschillende organen in vivo hebben in de regulering van de plasma VKAZ spiegels, wordt besproken. Spierweefsel en vetweefsel zijn het belangrijkste voor de afbraak van VKAZ, geoordeeld naar het vermogen om VKAZ af te breken en naar de omvang van deze weefsels in het lichaam. Het vermogen van weefsels om VKAZ af te breken kan, zowel in vitro als in vivo, beïnvloed worden door een aantal factoren. De belangrijkste zijn veranderingen in het transport van de VKAZ over de celmembraan, in de gevoeligheid van de weefsels voor insuline, en in de activiteit van de enzymen die betrokken zijn bij de afbraak van de VKAZ.

Om het mechanisme te kunnen bestuderen dat ten grondslag ligt aan de verlaging van de plasma VKAZ spiegels in patiënten of proefdieren met een verminderde leverfunctie, dient geschikt te worden over een proefdier model dat zowel verhoogde plasma insuline spiegels heeft als verlaagde plasma VKAZ spiegels. Bovendien mogen zich in dat proefdier model niet gelijktijdig andere condities manifesteren die de plasma VKAZ spiegels zouden kunnen beïnvloeden, zoals b.v. ondervoeding, hongeren, diabetes of sepsis. Zo'n diermodel (ratten met een porta-cavale shunt (PCS)) wordt beschreven in hoofdstuk II. Het model werd nauwkeurig gedefinieerd met betrekking tot relevante parameters in relatie tot de tijdsduur na de operatie. Tot 3 weken na de operatie vertoonden de PCS ratten hyperinsulinisme en lage plasma VKAZ spiegels. Over het algemeen waren deze ratten in ons instituut gezond, vergeleken met literatuurgegevens.

Twee en een halve week na de operatie werden spierweefsel (diaphragma) en epididymaal vetweefsel van PCS-geopereerde ratten en van controle ratten (sham operatie) gebruikt voor de bestudering in vitro van de metabolisering van VKAZ (hoofdstuk III en IV). De PCS had geen invloed op de mate van irreversibele afbraak van VKAZ in spierweefsel of verlaagde deze zelfs. In vetweefsel bleek de hoeveelheid VKAZ die irreversibel werd afgebroken sterk verhoogd als gevolg van de PCS. Alle drie de VKAZ werden in gelijke mate verhoogd afgebroken in vetweefsel van PCS ratten. Het gedeelte van het koolstofskelet dat overblijft na irreversibele decarboxylering in vetweefsel, wordt via acetyl-CoA ingebouwd in vet (voornamelijk in de triglyceriden) of wordt verbrand tot CO_2 . Dit betekent dat andere afbraak routes voor

VKAZ in vetweefsel verwaarloosbaar zijn. Daarentegen is de afbraak van de VKAZ in spierweefsel onvolledig. In vetweefsel van PCS ratten worden, zelfs na een dag en een nacht vasten, nog steeds meer VKAZ afgebroken dan in vetweefsel van gevoede controles. Dit geeft aan dat dit proces aan lange termijn regulatie onderhevig is. Derhalve moet vetweefsel uiterst belangrijk zijn voor de afbraak van VKAZ. Na PCS is deze rol nog veel belangrijker en het lijkt er sterk op dat vetweefsel, en dus niet spierweefsel, bijdraagt aan de verlaging van de plasma VKAZ spiegels na PCS. De eiwitsynthese in spierweefsel en de vetzuursynthese in vetweefsel waren verhoogd na PCS. Omdat zowel de spiermassa als de vetmassa in PCS ratten kleiner is dan in controle ratten, betekenen deze verhogingen dat zowel de eiwitturnover als de vetturnover verhoogd moeten zijn. Verhoogde eiwitturnover is ook vastgesteld bij patiënten met lever cirrhose.

Het vermogen van spierweefsel en vetweefsel om VKAZ af te breken, wordt voornamelijk bepaald door de activiteit van het vertakte keten oxo-zuur dehydrogenase (VKOZ-DH), dat snelheidsbeperkend is in de afbraak van VKAZ in deze weefsels. De activiteit van dit enzym kan in vetweefsel beïnvloed worden door insuline. In spierweefsel is dit niet het geval. Gebaseerd op de hoeveelheden VKAZ die konden worden afgebroken, mocht na PCS een verhoogde VKOZ-DH activiteit verwacht worden in vetweefsel, en een onveranderde of verminderde activiteit van dit enzym in spierweefsel. Deze verwachtingen werden bevestigd in experimenten die beschreven zijn in hoofdstuk V. Dit betekent vrijwel zeker dat de verhoogde insuline spiegels die bestaan na PCS, effectief zijn in de inductie van VKOZ-DH activiteit in vetweefsel. De relevantie van deze bevindingen wordt besproken in hoofdstuk VI.

De resultaten steunen de hypothese dat hyperinsulinisme bijdraagt tot de verlaging van plasma VKAZ spiegels na een porta-cavale shunt. Verhoogde ammoniak spiegels zouden een additionele invloed op de VKAZ spiegels kunnen uitoefenen. Hyperinsulinisme zou het gevolg kunnen zijn van gelijktijdige verhogingen van catecholamines, glucagon en cortisol in het plasma. Deze verhogingen zijn in de literatuur beschreven zijn bij leverpatiënten en weerspiegelen een stress-toestand. De resultaten van in vitro studies van de afbraak van VKAZ in vetweefsel van ratten met diabetes of obesitas, die eveneens veranderde plasma insuline- en VKAZ spiegels vertonen, suggereren dat het mechanisme dat zorgdraagt voor de verandering van de plasma VKAZ spiegels, meer algemene geldigheid heeft.

Een toename van de eiwit- en vetzuursynthese en verhoogde afbraak van VKAZ in vetweefsel na PCS lijken alle te wijzen op een goed gevoed proefdier, zoals aangegeven door hoge insuline spiegels. PCS ratten zijn over het algemeen echter minder goed gevoed dan controle ratten. De toename van eiwitafbraak of een verminderde groeisnelheid optredend bij PCS ratten zou daarom langs indirecte weg veroorzaakt kunnen worden door hoge insuline spiegels die een goede voedingstoestand suggereren die in werkelijkheid niet bestaat. Het koolstofskelet dat overblijft na decarboxylering van de VKAZ, werd na PCS minder volledig afgebroken in diaphragma. Dit pleit tegen de hypothese dat een toename van de afbraak van VKAZ in skeletspier het gevolg zou zijn van een energie tekort in spierweefsel.